

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の ファージ型による疫学的調査

小穴こず枝¹⁾, 清水 環¹⁾, 吉田雅子¹⁾, 塚田美智代¹⁾
山本貴子¹⁾, 寺澤文子¹⁾, 亀子文子¹⁾, 山田喜紹²⁾
沖村幸枝³⁾, 赤羽貴行³⁾, 川上由行³⁾

Epidemiological investigation on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical specimens by phage-typing

We have classified 686 strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) which were isolated from clinical specimens at Shinshu University Hospital between October 1991 and October 1993, by phage-typing system for the purpose of epidemiological investigation. Phage-typing was determined by using the international set of phages.

The majority (429 strains : 62.5%) of the strains were non-typable, and typable strains were consisted of 170 mixed group strains (24.8%), 30 group V strains (4.4%), 25 group I strains (3.6%), 24 group III strains (3.5%), and 8 miscellaneous group strains (1.2%).

The strains, assigned to group I, were lysed with phage 29 or 80. In particular, all strains of group V were lysed with only phage 94 and the strains of miscellaneous group were lysed with phage 95 alone, respectively.

Moreover, the strains, assigned to mixed group, were found to be classified into three different lytic groups. The first lytic group involving 125 strains were lysed with phages including phages 29, 52, 71, 83A, 84, 96, and/or 95. Thirty-eight strains of the second lytic group were lysed with phages including phages 80, 3A, 3C, 6, 42E, 47, 54, 75, 94, and/or 81. The third lytic group comprising 7 strains were sensitive to phages that lysed the strains of both the first and second lytic groups.

Key Words :

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA, メチシリン耐性黄色ブドウ球菌), Phage-typing (ファージ型別), Epidemiological investigation (疫学的調査)

1) 信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科 : OANA Kozue, SHIMIZU Tamaki, YOSHIDA Masako, TSUKADA Michiyo, YAMAMOTO Takako, TERASAWA Fumiko, KAMEKO Fumiko, Dept. of Medical Technology, School of Allied Medical Sciences, Shinshu Univ.

2) 信州大学医療技術短期大学部看護学科 : YAMADA Yoshitsugu, Dept. of Nursing, School of Allied Medical Sciences, Shinshu Univ.

3) 信州大学医学部附属病院中央検査部 : OKIMURA Yukie, AKAHANE Takayuki, KAWAKAMI Yoshiyuki, Central Clinical Laboratory, Shinshu Univ. Hospital

はじめに

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus, MRSA) を原因菌とする院内感染の予防対策としては, MRSA の検出状況の正確な把握と疫学的調査とが特に重要である. 疫学的調査のための指標として, ファージ型による型別が用いられることがある. この方法はプロファージとして *Staphylococcus aureus* の染色体に組み込まれているファージを分離して純化し, その中から特定の相互に異なる宿主域を示すファージを選択して, 型別用ファージとしてセット化し, それらを用いて被験菌株の各型別用ファージに対する感受性を観察する方法である¹⁾. その溶菌パターンから *S. aureus* の由来や起源が同一であるか否かなど, 疫学的調査のための一つの指標として利用することが可能である²⁾. 今回, 信州大学医学部附属病院中央検査部において臨床材料より分離された MRSA について, 標準型別ファージを用いてファージ型別を行い, 疫学的検討を行ったので報告する.

材料および方法

1. 供試菌株

1991年10月から1993年10月までに当院中央検査部において臨床材料から分離された686株の MRSA を供試菌株とした. 供試菌株が *S. aureus* であることの同定は ID テスト SP-18 (日水) およびコアグラゼテスト (栄研) により行った. MRSA の判定基準は 1 濃度ディスク法 (昭和) による検出法に準拠した³⁾. なお, 同一患者の同時期ないし同種検体から繰り返し検出されたものは最初の分離株のみを対象とした. また, 1991年10月から同年11月を第1期, 1992年1月から同年6月を

第2期, 1992年7月から同年12月を第3期, 1993年1月から同年6月を第4期および1993年7月から同年10月を第5期として集計した (表1).

表1 供試菌株の内訳

時 期	菌株数 (%)	入院・外来	
		入院患者	外来患者
第1期	33(4.8)	31	2
第2期	114(16.6)	105	9
第3期	210(30.6)	198	12
第4期	177(25.8)	152	25
第5期	152(22.2)	127	25
計(%)	686	613(89.4)	73(10.6)

2. ファージ型別

型別用ファージは群馬大学医学部附属薬剤耐性菌実験施設より分与を受け, -80°C に保存しておいた23種類の標準型別ファージを使用した. その内訳は I 群が5種類 (29, 52, 52A, 79, 80), II 群が4種類 (3A, 3C, 55, 71), III 群が10種類 (6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84, 85), V 群が2種類 (94, 96) および雑群が2種類 (81, 95) である. まず, 各ファージは10倍段階希釈してそれぞれに対応する指示菌を用いて力価を測定した. 指示菌が完全に溶菌したファージ液の最高希釈の点を RTD (Routin Test Dilution) とした. 各供試菌株はトリプトソイブイオン培地 (栄研) で 37°C 一夜培養し, この菌液をカルシウム加普通寒天培地 (栄研) 上に広げ, 自然乾燥後, エーゼで23種類のファージ液を接種した. ファージ液は $\times 100$ RTD を用いた. 30°C 一夜培養し, 溶菌の有無により判定した. いずれのファージによっても溶菌されない場合は型別不能とした^{1,2)}. 溶菌パターンの結果から, 供試菌株の群別を行い, さらに各群内での型別を行った.

成績

1. ファージ型の分布

供試菌全体では型別不能が62.5%と最も多く、ついで混合群、V群、I群、III群および雑群の順であった。入院・外来別ともに型別不能株が多かった(図1)。

各群を溶菌パターンにより分類すると(表2)、I群は10株が29あるいは29/52のファージにより溶菌し、残りの15株は80により溶菌した。III群は16種類の溶菌パターンに型別され、各溶菌パターンはほとんどが1~2株であった。V群はすべて94のみに、雑群はすべて95のみにより溶菌した。170株の混合群は76種類の溶菌パターンに型別されたが、三つの

溶菌群に大別された。第一の溶菌群は29, 52, 71, 83A, 84, 96, 95等を含む125株、第二の溶菌群は80, 3A, 3C, 6, 42E, 47, 54, 75,

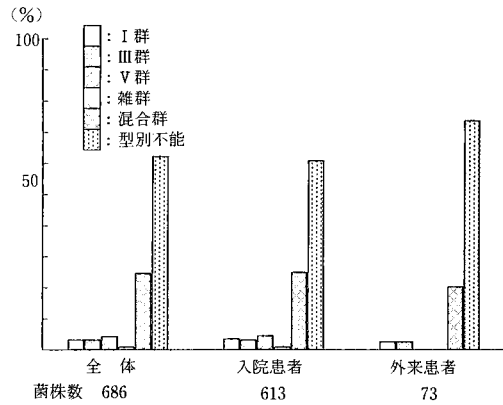


図1 MRSA のファージ型の分布

表2 MRSA の主な溶菌パターン

ファージ群	主な溶菌パターン	菌株数 (%)	時 期				
			第1期	第2期	第3期	第4期	第5期
I 群	29/52	2(0.3)		1(0.9)			1(0.7)
	29	8(1.2)	1(3.0)	2(1.8)	2(1.0)	1(0.6)	2(1.3)
	80	15(2.2)		3(2.6)	9(4.3)	3(1.7)	
III群		24(3.5)	2(6.1)	4(3.5)	5(2.4)	6(3.4)	7(4.6)
V群	94	30(4.4)	6(18.2)	5(4.4)	9(4.3)	7(4.0)	3(2.0)
雑群	95	8(1.2)		2(1.8)	6(2.9)		
混合群		170(24.8)	9(27.3)	20(17.5)	56(26.7)	42(23.7)	43(28.3)
第一の溶菌群	29, 52, 71, 83A, 84, 96, 95等	125(18.2)	5(15.2)	9(7.9)	42(20.0)	31(17.5)	38(25.0)
I II V 雑群	29/52/71/96/95	49(7.1)		1(0.9)	14(6.7)	19(10.7)	15(9.9)
	29/71/96/95	1(0.1)			1(0.5)		
I II V 群	29/52/71/96	10(1.5)			1(0.5)	3(1.7)	6(3.9)
	29/71/96	4(0.6)			2(1.0)	1(0.6)	1(0.7)
I II 雑群	29/52/71/95	12(1.7)		1(0.9)	7(3.3)	3(1.7)	1(0.7)
その他		49(7.1)	5(15.2)	7(6.1)	17(8.1)	5(2.8)	15(9.9)
第二の溶菌群	80, 3A, 3C, 6, 42E, 47, 54, 75, 94, 81等	38(5.5)	3(9.1)	9(7.9)	14(6.7)	10(5.6)	2(1.3)
第三の溶菌群	29, 52, 52A, 79, 42E, 47, 54, 75, 77, 84等	7(1.0)	1(3.0)	2(1.8)		1(0.6)	3(2.0)
型別不能		429(62.5)	15(45.4)	77(67.5)	123(58.6)	118(66.7)	96(63.2)
計		686	33	114	210	177	152

94, 81等を含む38株, 第三の溶菌群は第一と第二の両方の溶菌群に感受性を示すファージにより溶菌した7株であった. 76種類の溶菌パターンは1~2株ずつのものがほとんどであったが, 第一の溶菌群で29/52/71/96/95を主としたI・II・V・雑群, I・II・V群, I・II・雑群の溶菌パターンの株が多数認められた.

2. ファージ型の時期的な変遷

時期的な変遷をみると(図2, 表2), 各時期ともに型別不能株が多く, 第2期以降は約60%前後を占めていた. I群に型別された株は各時期において約2~5%で, 第2期と第3期は若干多く, 80のファージにより溶菌した株が第2期から第4期に出現していた. 29のファージにより溶菌した株の占める割合に顕著な時期的な変化は認められなかった. III群は第1期の6.1%がその後減少し, V群も第1期の18.2%がその後減少し第5期は2.0%であった. 雑群は第2期と第3期のみ認められた. 混合群は各時期において約2~3割を占めていた. 混合群の第一の溶菌群は第3期から第5期の期間において混合群の中でも約7~9割を占め, 特に29/52/71/96/95を主とした溶菌パターンの株が多数認められた.

一方, 第二の溶菌群は減少傾向を示した.

3. 病棟別のファージ型の分布

I群の80のファージにより溶菌した株は第2期の1992年6月に初めて出現し, その後の1年間に15株が認められた. これらは同一病棟の患者とその外来患者由来株であり, さらに近接している別の病棟の患者からも分離された. 29と29/52により溶菌した株は特定の病棟に限られることはなかった. 同一病棟から全期間にわたり8株のIII群が分離されていたが, その溶菌パターンはそれぞれ異なるものであった. V群の株はすべて入院患者由来であり, 外科系病棟由来株が多かったが, 特定の期間や病棟に偏ることはなかった. 雑群のうち6株は同一病棟由来株であった. 混合群の第一の溶菌群のなかで29/52/71/96/95を主としたI・II・V・雑群, I・II・V群, I・II・雑群の溶菌パターンの株の由来をみると, 同じ建物で階の異なる数病棟や, 位置的には離れている関連病棟からも多数分離されていた.

考察

MRSAによる院内感染に対する効果的な対策を施行するためには, まずその実態を正

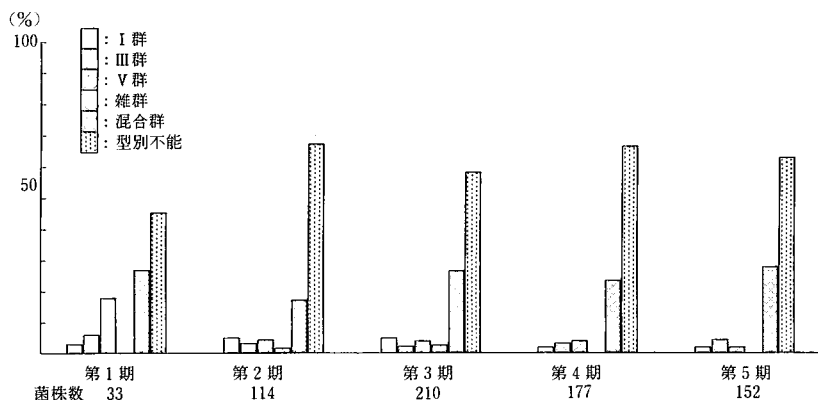


図2 MRSAのファージ型の時期的変遷

しく把握することが第一歩である。したがって、疫学的方法による調査の果たす役割は大きいと考えられる。疫学的調査の指標として、検査室においては検査が簡便なことからコアグラゼ型による型別が広く用いられ、全国的な調査も行われている⁴⁻⁶⁾。大久保ら⁶⁾によると、全国の国立大学病院由来 MRSA のコアグラゼ型は72%がII型であり、IV型、III型、VII型の順で検出され、地域別には北海道、東北、関東ではII型が85%以上を占めて、その他の地域においてもコアグラゼ型に特徴が認められた。これら全国的な調査の他に、コアグラゼ型による型別が長期的な疫学的検討のために有用であることは認められているところである。しかし、今日、本邦において、施設内で分離される MRSA はコアグラゼII型が主流であるという報告⁷⁻¹¹⁾が多い。当院で分離された MRSA も約90%がコアグラゼII型であった¹²⁾。このような状況で、施設内で分離された MRSA の疫学的調査にコアグラゼ型による方法を用いるには限界がある。また、高価な抗血清を使用しなければならないという問題もある。染色体 DNA、コアグラゼ遺伝子 DNA、リボゾム RNA 遺伝子 DNA などについての RFLP (restriction fragment length polymorphism) を利用した分子生物学的手法を用いた遺伝型による型別¹³⁻¹⁵⁾は、現在のところ検査室レベルで日常的に実施するには手技の煩雑さ、特別な機器の必要性、高コスト、所用時間等いくつかの問題を含んでいる。一方、ファージ型による方法はファージ液の力価測定から型別判定までに数日間かかるという難点はあるが、特別な機器・試薬を必要とせず、したがって低コストで済む。また、慣れれば比較的容易に実施することができる。

今日、本邦で蔓延している MRSA の多く

はファージ型III群または型別不能である¹⁶⁾。河野ら¹⁷⁾によるとIII群が33%で、同一時期の他施設の MRSA と比べると各群の比率は施設ごとに異なっていた。今回の調査では型別不能が62.5%を占め、ついで混合群24.6%、V群4.4%、I群3.6%、III群3.5%および雑群1.2%であった。当院のこれ以前の2年間の調査では型別不能59.8%、混合群22.5%、III群7.8%、V群6.0%、I群3.3%および雑群0.6%であった¹⁸⁾。以上の成績からIII群が多いとする他施設の報告とは異なり、当院ではIII群が少なく減少傾向を示し、型別不能株が過半数以上を占め、MRSA の各群の比率は施設ごとに異なることが確認された。また、本邦以外のファージ型別の報告によると、ヨーロッパの10カ国から分離された MRSA の76%がIII群に型別され、型別不能は13%だけであった¹⁹⁾。その他にもIII群に型別される株が最も多かったとする報告があり²⁰⁻²²⁾、それらはそれぞれ異なるファージに対して溶菌を示し、77²⁰⁾、75/85²¹⁾あるいは85、84、47²²⁾であった。これらは溶菌群、溶菌パターンともに、当院の今回の結果と明らかに差異が認められた。一方、Hanifan YA²³⁾はほとんどが型別不能であったと報告している。このように、現在流行している MRSA の型は地域、国によっても異なり、標準ファージによる型別は国際的な比較が可能な方法の一つと考えられる。

型別された群内での溶菌パターンをみると、I群の80により溶菌した MRSA がある病棟とその外来患者、さらに近接している別の病棟の患者からも認められ、雑群の95により溶菌した MRSA が別の病棟から複数株分離され、また、29/52/71/96/95を主とした溶菌パターンの混合群の MRSA が第3期以降に同じ建物で階の異なる数病棟や、位置的には離れている関連病棟からも多数分離される

など、溶菌パターンの同じMRSAによる特定の病棟における特定の期間での流行が疑われた。また、ある病棟からIII群に型別されたMRSAが複数株分離されていたが、その溶菌パターンから同一の溶菌パターンのMRSAによる流行は否定されるなど、ファージ型別は施設内、病棟内での実態を正しく把握するための疫学的指標として有用であると考えられる。また、患者の院内での生活空間としての行動範囲との関連、患者の病棟内外での転室、医療従事者、医療機器・器具を介しての伝播など院内での伝播経路を推察するうえでもファージ型別は疫学的指標として有用であると考えられる。紺野ら²⁴⁾はMRSAの薬剤耐性型により特定のファージ型に偏りがあり、また、薬剤耐性型は同じものでも施設により異なっていたことも示している¹⁾。今回は薬剤耐性との関係は検討していないが、MRSAの薬剤耐性型の動向をみるうえにもファージ型別は有益であると考えられる。

今回のファージ型別は、国際ファージ型別委員会により設定されている23種類の標準型別ファージにより実施したが、前述の通り型別不能株が約60%と多数存在した。すでに型別率の改善のための新たなファージとして、いくつかの方法が検討されている^{25,26)}。保科ら²⁵⁾はコアグラゼ陰性ブドウ球菌のファージのなかから識別能、型別能の良好なファージを選び、標準型別ファージセットに加えた。その結果、MRSAに対する型別率は85%と良好であり、今まで型別されていた株はさらに新しいファージの導入でパターンが細分化され、識別能が改善されたという。井上ら²⁶⁾はMRSAで増殖させた標準型別ファージと臨床材料から分離したファージを用いて型別を行い、型別率の上昇を得ている。標準型別ファージセットとしても、現状に即した見直

しが必要であると考えられるが、標準型別ファージは国際的なものであり、本邦の事情だけによるファージセットの変更は難しいであろう。現在、これらの新たなファージによる検討は一部の施設に限られ、施設間での比較には問題もある。しかし、同一施設内でのMRSAの疫学的調査のための指標として標準型別ファージセットとともに用いるならば、これらの新しいファージによる型別は、有益な疫学的情報を与えてくれるものと考えられる。

以上、ファージ型別は特別の機器・試薬が必要なく、低コストで済み、比較的容易に実施することができる。また、型別された株の溶菌パターンをみることにより、疫学的指標として有用な情報が得られるものと考えられる。

おわりに

1991年10月から1993年10月までに信州大学医学部附属病院中央検査部において臨床材料から分離されたMRSA 686株について、標準型別ファージを用いたファージ型別による疫学的調査を行った。

供試MRSA全体では型別不能が429株(62.5%)と最も多く、ついで混合群が170株(24.8%)、V群が30株(4.4%)、I群が25株(3.6%)、III群が24株(3.5%)および雑群が8株(1.2%)の順であった。I群に型別された株は29と80により溶菌し、III群は様々な溶菌パターンを示した。V群はすべて94に、雑群はすべて95により溶菌した。混合群は三つの溶菌群に大別された。第一の溶菌群は29, 52, 71, 83A, 84, 96, 95等を含む125株、第二の溶菌群は80, 3A, 3C, 6, 42E, 47, 54, 75, 94, 81等を含む38株、第三の溶菌群は第一と第二の両方の溶菌群に感受性を示す

ファージにより溶菌した7株であった。型別された株の溶菌パターンをみると時期的な変遷が認められ、特定の期間に特定の病棟においていくつかの溶菌パターンのMRSAによる流行が疑われ、ファージ型別は、疫学的指標として有用であると思われた。

文献

- 1) 紺野昌俊, 生方公子: 黄色ブドウ球菌のファージ型別. 臨床と微生物, 15: 5-9, 1988.
- 2) 井上松久, 大久保豊司: 黄色ブドウ球菌のファージ型別法. 検査と技術, 17: 1611-1615, 1989.
- 3) 昭和薬品化工株式会社: MRSAの検出. 薬剤感受性試験昭和ディスクユーザーズマニュアル, 29-32, 昭和薬品化工株式会社, 東京, 1990.
- 4) 松本慶蔵, 他: MRSA感染症. 日本臨床, 51: 884-892, 1993.
- 5) 菅野治重: 生物型からみたMRSAの変遷と薬剤耐性. 内科, 70: 632-636, 1992.
- 6) 大久保豊司, 他: MRSAのcoagulase型とphage型. 臨床と微生物, 20: 366-367, 1993.
- 7) 佐藤敏夫, 他: 当院におけるMRSAの現状. 医学検査, 41: 538, 1992.
- 8) 村中利也, 他: 当院におけるMRSAの現状. 医学検査, 41: 538, 1992.
- 9) 市之川泉, 他: 臨床材料より分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の各抗生剤に対する感受性及びそのファージ型別の検討. 臨床病理, 40: 総会号165, 1992.
- 10) 田辺文憲, 他: 当院検出MRSAの性状と*mecA*. 臨床病理, 40: 総会号169, 1992.
- 11) 町田 博, 他: 横浜労災病院におけるMRSAの現状. 医学検査, 42: 572, 1993.
- 12) 小穴こず枝, 他: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の疫学的検索指標としてのコアグラゼ型別とファージ型別の意義. 生物試料分析, 17: 280-287, 1994.
- 13) Ichiyama S, et al.: Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 29: 2690-2695, 1991.
- 14) Goh SH, et al.: Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. J Clin Microbiol, 30: 1642-1645, 1992.
- 15) Thomson-Carter FM, Carter PE, Pennington TH: Differentiation of staphylococcal species and strains by ribosomal RNA gene restriction patterns. J Gen Microbiol, 135: 2093-2097, 1989.
- 16) 山口 恵三, 大野 章: MRSA感染症. INFECTION CONTROL, 1: 30-43, 1992.
- 17) 河野 緑, 他: 臨床材料より分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌のファージ型別成績とその疫学的検討. 臨床病理, 40: 総会号165, 1992.
- 18) 小穴こず枝, 他: 臨床材料から分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌のファージ型. 環境感染, 9: 28-33, 1994.
- 19) Voss A, et al.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 13: 50-55, 1994.
- 20) Trilla A, et al.: Clinical epidemiology of an outbreak of nosocomial infection caused by *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides: efficacy of control measures. Comite de Control de Infecciones. Med Clin, 100: 205-209, 1993.
- 21) Samra Z, Gadba R: Antibiotic susceptibility and phage typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates from blood cultures of 692 patients in 15 Israeli hospitals. Eur J Epidemiol, 9: 559-562, 1993.
- 22) Hamilton-Miller JM, Maple PA: Antibio-gram typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a comparison with phage typing, biotyping and API Staph. Int J Med Microbiol, 279: 214-224, 1993.

- 23) Hanifah YA : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)—phage-typing of Malaysian and international isolates. Singapore Med J, 32 : 438-440, 1991.
- 24) 紺野昌俊, 他 : 薬剤耐性型とファージ型から見たメチシリン耐性黄色ブドウ球菌について. 感染症学雑誌, 59 : 1029-1040, 1985.
- 25) 保科定頼, 他 : International phage set とコアグラージェ陰性ブドウ球菌型別ファージによる MRSA の型別成績について. 臨床と微生物, 20 : 366, 1993.
- 26) 井上松久, 他 : 黄色ブドウ球菌のファージ型別化の検討. 臨床と微生物, 19 : 387-388, 1992.

受付日 : 1995年9月26日

受理日 : 1995年11月21日